

VALIDAÇÃO DE MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE COBRE EM CAFÉ UTILIZANDO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM PEPTÍDEO

Gabriella Magarelli¹, Jonatas G. da Silva², Magali A. Rodrigues³, Jurandir R. de Souza⁴, Pierre Marraccini¹, Clarissa S.P. de Castro¹, Marcelo P. Bemquerer¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ²Universidade Católica de Brasília, ³Universidade de São Paulo, ⁴Universidade de Brasília. gabriella.magarelli@embrapa.br

Classificação: Desenvolvimento de sensores e biossensores nanoestruturados.

Resumo

Um biossensor voltamétrico contendo um peptídeo derivado do príon (H-CVNITKQHTVTTT-NH₂) como um elemento de reconhecimento de íons metálicos foi construído para a determinação de Cu(II) em amostras de café. A construção do biossensor foi realizada por automontagem da molécula contendo um grupo sulfidril em eletrodo de Au. A técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) utilizando o biossensor mostrou um sinal de corrente de redução de cobre bastante sensível, o que possibilitou sua utilização na determinação de cobre em amostras de café. As figuras analíticas de mérito do método foram as seguintes: precisão intra-dia (desvio padrão relativo (DPR= 13-14%); precisão inter-dia (DPR= 14-18%); linearidade ($r= 0,9995$); faixa de trabalho ($1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹); limite de detecção ($8,0 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹); limite de quantificação ($1,0 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹) e recuperação (95-117%). Observou-se que os íons metálicos Zn(II), Fe(II), Cd(II) e Ni(II) não interferiram nos sinais de Cu(II) na faixa de trabalho estudada.

Palavras-chave: Biossensor voltamétrico; Peptídeo (H-CVNITKQHTVTTT-NH₂); Cobre; Café.

VALIDATION OF VOLTAMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF COPPER IN COFFEE USING PEPTIDE MODIFIED GOLD ELECTRODE

Abstract

A voltammetric biosensor, containing a prion peptide fragment (H-CVNITKQHTVTTT-NH₂), as a metal ion recognition element was constructed for determination of Cu(II) metal ions in coffee samples. The biosensor construction was performed by self-assembly of the molecule containing a sulfhydryl group onto Au electrode. The differential pulse voltammetry (DPV) technique using the biosensor showed a very sensitive copper reduction current signal, which allowed its use in the determination of copper in coffee samples. The analytical figures of merit presented the following results: intra-day precision (relative standard deviation (RSD)= 12-14%); inter-day precision (RSD= 14-18%); linearity ($r= 0.995$); working range (from 1.0×10^{-7} to 1.0×10^{-6} mol L⁻¹); detection limit (8.0×10^{-8} mol L⁻¹); quantification limit (1.0×10^{-7} mol L⁻¹) and recovery (95-117%). An investigation of the biosensor selectivity in the presence of other metal ions such as Zn(II), Fe(II), Cd(II) and Ni(II) was carried out, and it was observed that these metal ions did not interfere in the Cu(II) in the working range studied.

Keywords: Voltammetric biosensor; Peptide (H-CVNITKQHTVTTT-NH₂); Copper; Coffee.

Publicação relacionada: SILVA, J.G.; MAGARELLI, G.; FREITAS, T.V.; SILVA, L.P.; SOUZA, J.R.; BEMQUERER, M.P.; De Castro, C.S.P. Utilização do eletrodo de ouro modificado com peptídeo da proteína príon para a determinação voltamétrica de Cu(II). In: VI Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2012, Fortaleza-CE. Anais do Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. São Carlos-SP: Embrapa Instrumentação, 2012. p. 1-530

1 INTRODUÇÃO

A utilização de fertilizantes cúpricos, que ainda é empregada em cultivos como o café, a uva e o cacau, pode levar a um aumento dos níveis toleráveis deste íon metálico causando efeitos tóxicos. Os íons metálicos estão presentes nos tecidos vegetais na ordem de nmol.L^{-1} a pmol.L^{-1} , sendo que valores insuficientes ou excessivos podem levar à toxicidade e à alteração na fisiologia da planta. Existem diversos esforços na literatura para a utilização de íons metálicos como indicadores de qualidade e de origem geográfica de produtos como o café e o vinho (MUÑIZ-VALENCIA *et al.*, 2013). Desta forma, a quantificação de íons metálicos em produtos de origem vegetal é um problema técnico-científico com impacto na produção agrícola. Uma das estratégias analíticas para a determinação de íons metálicos em tecidos é a utilização de biossensores, que apresentam biomoléculas como estruturas de detecção do composto alvo e como transmissores de sinais ópticos ou eletroquímicos. A detecção eletroquímica apresenta a vantagem de permitir a obtenção de uma resposta rápida, seletiva e sensível. Especialmente para a determinação de íons metálicos, ela é apropriada devido aos potenciais específicos de oxidação-redução de cada íon metálico. A possibilidade de miniaturização e portabilidade de biossensores torna-os uma ferramenta importante em agricultura de precisão, permitindo a detecção precoce de contaminantes como pesticidas e íons metálicos (SEKHON, 2014). A aplicação de peptídeos para a construção de eletrodos para a detecção de íons metálicos tem sido investigada, uma vez que eles possuem uma variedade de átomos doadores de elétrons que podem ligar-se seletivamente aos íons metálicos (LILLO; GALÁN-MASCAROS, 2014). Eletrodos de Au têm sido muito utilizados devido a facilidade de imobilização de biomoléculas por meio de automontagem de grupamentos sulfidríla (SAPSFORD *et al.*, 2013). Peptídeos podem ser ligados à superfície de Au pelos seus resíduos de cisteína ou por espaçadores contendo o grupamento sulfidríla (CHOW *et al.*, 2005). Neste trabalho, foi proposta a validação do método voltamétrico para a determinação de Cu(II) em amostras de café utilizando um biossensor contendo um peptídeo como elemento de reconhecimento. Os parâmetros de validação investigadas foram a precisão, a linearidade, a exatidão e a seletividade do biossensor frente a outros íons metálicos. O peptídeo escolhido é uma molécula com afinidade elevada ao Cu(II), derivado de um dos sítios de ligação a Cu(II) do prion. A construção do biossensor ocorreu por automontagem de molécula contendo um resíduo adicional de cisteína sobre eletrodos de Au.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ foi sintetizado por síntese em fase sólida com estratégia Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonila), foi purificado por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) e as frações cromatográficas atribuídas ao peptídeo foram verificadas por espectrometria de massa (MALDI-ToF/MS). A concentração da solução aquosa do peptídeo foi determinada por um método empírico, por medidas de absorvância (205, 215, 225 nm). As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm) e uma célula eletroquímica composta pelos seguintes eletrodos: ouro (Au, Φ 2mm) (trabalho), Ag/AgCl (referência) e platina (auxiliar). Antes de iniciar as medidas voltamétricas, o eletrodo de Au foi polido em suspensão aquosa de alumina 1,0 μm , limpo em acetona e em seguida etanol no ultrassom em banho por 10 minutos, posteriormente, limpo eletroquimicamente, em H₂SO₄ 1 mol L⁻¹, por 10 ciclos no intervalo de potencial de -0,300 V (potencial inicial, E_i) e 1,500 V (potencial de inversão, E_w) e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. O eletrodo de Au foi transferido para uma célula eletroquímica contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ do peptídeo dissolvido em tampão fosfato, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, sem agitação (30 min). A acumulação do Cu(II), no eletrodo, foi realizada em 10 mL de tampão fosfato, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, sob agitação durante 60 s. A regeneração do eletrodo foi realizada em solução de ácido perclórico $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ (30 s), potencial de 0,5 V, sob agitação. O Cu(II) foi determinado utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial com os seguintes parâmetros: velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , amplitude de pulso de 50 mV, potencial inicial (E_i) = 0,6V, potencial final (E_f) = -0,6V, eletrólito: tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0. O método foi validado (INMETRO) e os parâmetros determinados foram linearidade, faixa de trabalho, repetitividade (intra-dia), precisão intermediária (inter-dia), recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e seletividade frente a Zn(II), Fe(II), Cd(II), Ni(II). A curva analítica foi obtida por meio de seis adições de 10 μL de Cu(II) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. O método foi aplicado em amostras de grãos de café proveniente da Embrapa, variedade Catiguá MG2. Os frutos de café foram

despolpados, as sementes foram lavadas, secas à temperatura ambiente e guardadas em freezer. Os grãos foram torrados em estufa (200 °C, 1h) e pulverizados. Pesou-se 1 g do pó da semente em cadinho de porcelana para queima em mufla (570 °C, 14 h). O resíduo foi dissolvido com HCl suprapuro, e depois o ácido foi evaporado até quase securo. O resíduo foi diluído em 10 mL de água Milli-Q. O cobre foi determinado nas amostras de café pelo método de adição padrão (3 adições de 10 μL de Cu a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos da caracterização da interação do Cu(II) com o peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ por voltametria cíclica e voltametria de redissolução anódica foram realizados em etapa anterior (SILVA, J.G. *et al.*, 2012). Nesta nova etapa do projeto, foram estudadas e obtidas as condições analíticas ideais para a aplicação do biossensor na determinação de Cu(II) nas amostras de café, incluindo a validação do método. Após a otimização dos parâmetros eletroquímicos, a curva analítica de Cu(II) foi obtida utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Nos voltamogramas (Figura 1) obtidos para o Cu(II), em tampão fosfato, pH 7,0, observa-se sinal em 0,20 V, correspondente à sua redução no eletrodo de ouro modificado com o peptídeo. Este sinal pode ser utilizado na detecção e quantificação de Cu(II) em matrizes diversas. A curva analítica apresentou a equação $I_{pc} (\mu\text{A}) = 0,57 + 6,0 \times 10^6 [\text{Cu(II)}]$ ($r = 0,999$), linearidade de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com limite de detecção (LD) = $8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de quantificação (LQ) = $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

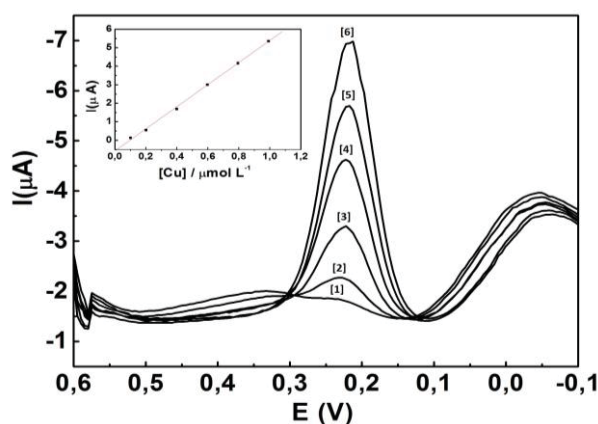


Figura 1: Voltamogramas de pulso diferencial [1] à [6] em 10 mL de tampão fosfato, $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, de seis adições sucessivas de 10, 20, 40, 60, 80, 100 μL de solução padrão de Cu(II) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = 0,60 \text{ V}$; $E_f = -0,10 \text{ V}$, amplitude de pulso = 50 mV, velocidade de varredura (v) = 50 mV s^{-1} , eletrodo de trabalho: eletrodo de ouro modificado com o peptídeo, eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L^{-1}). Eletrodo auxiliar: platina.

O estudo da variação do sinal de redução do cobre utilizando o biossensor após sete repetições no mesmo dia, em três níveis de concentração, apresentou um desvio padrão relativo (DPR) de 12-14%, e em dias diferentes apresentou DPR entre 14 e 18%. A precisão do biossensor foi considerada aceitável, visto que, a cada medida realizada no mesmo dia, a superfície do eletrodo é regenerada para a retirada do cobre e nova imobilização do peptídeo ocorre. Para medidas realizadas em dias diferentes, um biossensor novo é construído. No estudo da seletividade, observou-se que a presença dos íons metálicos Zn(II), Fe(II), Cd(II), Ni(II) não interferiu de forma significativa sobre a curva analítica do cobre (Figura 2). O desvio padrão relativo referente aos coeficientes angulares das curvas analíticas foi de 7%, mostrando a seletividade elevada do método na determinação de Cu(II). A figura 3 mostra o voltamograma da amostra de café com adições sucessivas de padrão de cobre. Nas condições otimizadas, a amostra apresentou sinal detectável de cobre, livre de interferentes, no potencial de estudo (0,2 V) e dentro da faixa de trabalho, o que mostrou a eficácia do método de preparo de amostras e a eficiência do biossensor. No estudo da exatidão do método, a taxa de recuperação de cobre adicionado sobre a amostra variou de 95-117% para três níveis de concentração.

A concentração de cobre encontrada na amostra de café proveniente da Embrapa Hortaliças (DF) cultivar CATIGUA MG2, foi de $6,7 \pm 1,2 \mu\text{g g}^{-1}$ ($n = 3$), o que está coerente com dados da literatura para grãos de café (MARTÍN *et al.*, 1999). O método será aplicado para amostras provenientes da Embrapa Cerrados, que sofreram tratamento com fertilizantes cúpricos.

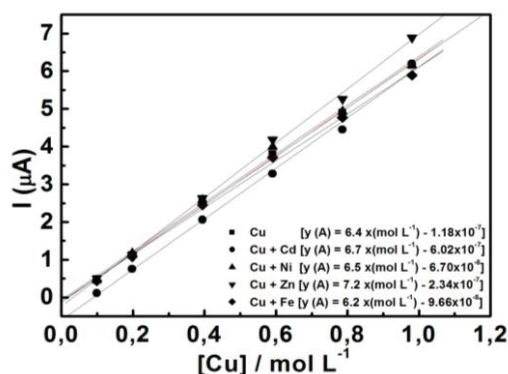


Figura 2: Curvas analíticas obtidas para adições padrão de Cu(II) ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em 10 mL de tampão de fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0, na presença de Cd(II), Zn(II), Ni(II) e Fe(II) a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

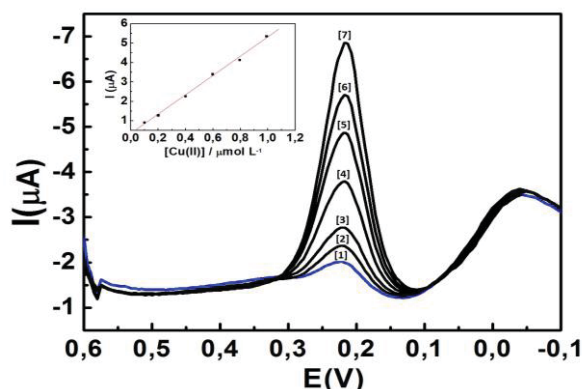


Figura 3: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos de 200 μL de amostra de café (CATIGUA MG2) [1], em 10 mL de tampão de fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0, com seis adições padrão de 10 μL de Cu(II) a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ [2] à [7]. (E_i) = 0,6 V, (E_f) = -0,1 V, amplitude do pulso = 50 mV, velocidade de varredura (v) = 50 mV s⁻¹, eletrodo de trabalho: eletrodo de ouro modificado com o peptídeo, eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹), eletrodo auxiliar: fio de platina.

4 CONCLUSÃO

A metodologia mostrou-se de boa precisão e exatidão e limites baixos de detecção e quantificação. Estudos de seletividade do biossensor por análise de cobre na presença de Cd(II), Zn(II), Ni(II) e Fe(II) mostraram que estes íons metálicos não causaram interferência significativa na faixa analítica de Cu(II) pelo biossensor. Os resultados apresentados mostraram a eficiência do biossensor peptídico na determinação de Cu(II) em amostras de café.

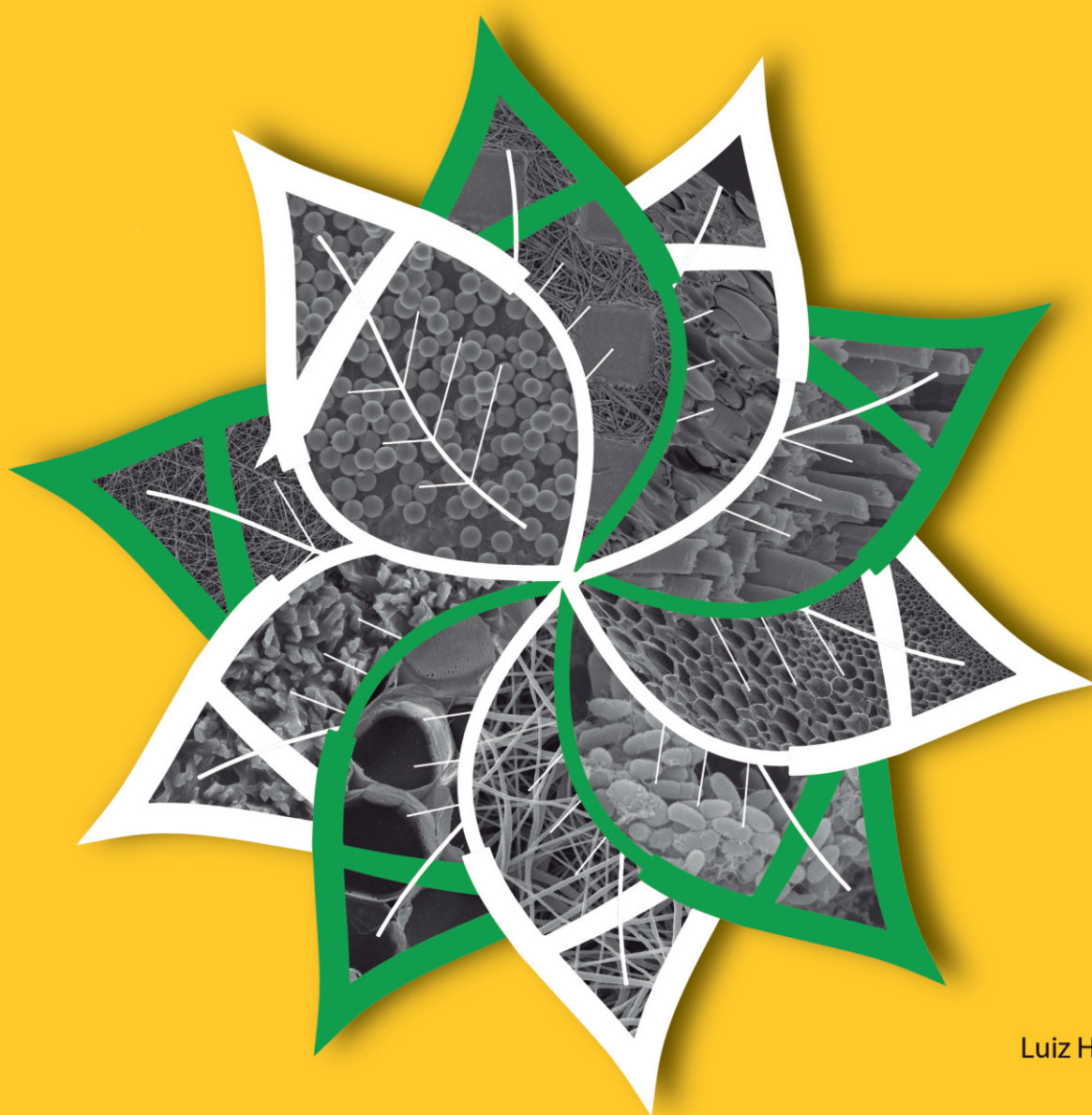
AGRADECIMENTOS

Embrapa, Capes, CNPq.

REFERÊNCIAS

- CHOW, E. *et al.* Electrochemical detection of lead ions via the covalent attachment of human angiotensin I to mercaptopropionic acid and thioctic acid self-assembled monolayers. *Analytica Chimica Acta*, v.543, n.1-2, p.167-176, julho 2005.
- INMETRO. DOC-CGECRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos, Revisão 5, 2016.
- LILLO, V. *et al.* Transition metal complexes with oligopeptides: single crystals and crystal structures. *Dalton Transactions*, v.43, n.26, p.9821-9833, julho 2014.
- MARTÍN, M. J. *et al.* Characterization of arabica and robusta roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content. *Food Chemistry*, v.66, n.3, p.365-370, agosto 1999.
- MUÑIZ-VALENCIA, R. *et al.* Geographical differentiation of green coffees according to their content by means of supervised pattern recognition techniques. *Food Analytical Methods*, v.6, n.5, p.1271-1277, outubro 2013.
- SAPSFORD, K E. *et al.* Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical Reviews*, v.113, n.3, p.1904-2074, março 2013.
- SEKHON, B.S. *et al.* Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, Science & Applications*, v.7, n.31, p.31-53, maio 2014.

Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio Anais do IX Workshop 2017



Editores

Caue Ribeiro de Oliveira
Elaine Cristina Paris
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Marcelo Porto Bemquerer
Maria Alice Martins
Odílio Benedito Garrido de Assis

ISSN 2175-8395

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**ANAIS DO IX WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA
APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

Caue Ribeiro
Elaine Cristina Paris
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Marcelo Porto Bemquerer
Maria Alice Martins
Odílio Benedito Garrido de Assis

Editores

Embrapa Instrumentação

São Carlos, SP

2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452

Caixa Postal 741

CEP 13560-970 - São Carlos-SP

Fone: (16) 2107 2800

Fax: (16) 2107 2902

www.embrapa.br/instrumentação

E-mail: www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Wilson Lopes da Silva

Secretária executiva: Maria do Socorro Gonçalves de Souza Monzane

Membros:

Carlos Renato Marmo

Cínthia Cabral da Costa

Cristiane Sanchez Farinas

Elaine Cristina Paris

Maria Alice Martins

Paulo Renato Orlandi Lasso

Capa - Desenvolvimento: NCO; criação: Letícia Longo

Editoração eletrônica: Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2017): tiragem 300

As opiniões, conceitos, afirmações e conteúdo desta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados internacionais de catalogação (CIP)

Embrapa Instrumentação

Anais do IX Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio – 2017 – São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2017.

ISSN 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Ribeiro, Caue. II. Paris, Elaine Cristina. III. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. IV. Bemquerer, Marcelo Porto. V. Martins, Maria Alice. VI. Assis, Odílio Benedito Garrido de. VII. Embrapa Instrumentação.